

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-510474

(43) 公表日 平成8年(1996)11月5日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 35/78	A B S	7431-4C	A 6 1 K 35/78	A B S X
31/705	A D Z	8314-4C	31/705	A D Z
35/78	A C B	7431-4C	35/78	A C B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 41 頁)

(21) 出願番号	特願平7-523729	(71) 出願人	ベルビィ・ゲゼルシャフト・ミト・ベシュ レンクテル・ハフツング
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)3月16日		オーストリア国、アー-1010 ウイーン、 フライウング、6/6/9
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)11月16日	(72) 発明者	ビンダー・ペルント
(86) 国際出願番号	P C T / A T 9 5 / 0 0 0 4 9		オーストリア国、アー-1090 ウイーン、 シュヴァルツシュパニールストラッセ、17
(87) 国際公開番号	W O 9 5 / 2 4 9 0 5	(72) 発明者	ツハング・ヴァイエアン
(87) 国際公開日	平成7年(1995)9月21日		オーストリア国、アー-1090 ウイーン、 シュヴァルツシュパニールストラッセ、17
(31) 優先権主張番号	A 5 6 1 / 9 4	(72) 発明者	ヴォーユタ・ヨハン
(32) 優先日	1994年3月16日		オーストリア国、アー-1090 ウイーン、 シュヴァルツシュパニールストラッセ、17
(33) 優先権主張国	オーストリア (A T)	(74) 代理人	弁理士 江崎 光好 (外3名)
(81) 指定国	E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), J P, K R, U S		

(54) 【発明の名称】 ノトジンセノシド R 1 (N R 1) 及び／又はアストラガルシド (A S I V) のようなトリテルペンサポニン類を医薬の製造に使用する方法

(57) 【要約】

ノトジンセノシド R 1 (N R 1) 及び／又はアストラガルシド (A S I V) のようなトリテルペンサポニン類を、繊維素溶解活性の刺激のための、及び内毒素効果の防止のための、特に内毒素ショック状態の患者及び動物を処置し、又は内毒素ショックを回避するための医薬の製造に使用する方法。対応する医薬は冠動脈性心臓疾患、抹消動脈疾患を有する患者及び心筋梗塞又は狭心症にかかっている患者の治療的処置、並びに健康な人々をそのような疾病に対して予防するためにも適している。

【特許請求の範囲】

1. ノトジンセノシドR1 (NR1) 及び／又はアストラガロシド (ASIV) のようなトリテルペンサポニン類を繊維素溶解活性の低下した状態又は内毒素効果の処置のための医薬の製造のために使用する方法。
2. ノトジンセノシドR1 (NR1) 及び／又はアストラガロシド (ASIV) のようなトリテルペンサポニン類を内毒素ショック状態の患者又は動物の処置のため、又は内毒素ショックの防止のための医薬の製造に使用する、請求の範囲1に従う方法。
3. ノトジンセノシドR1 (NR1) 及び／又はアストラガロシド (ASIV) のようなトリテルペンサポニン類を、冠状動脈性心臓疾患、抹消動脈疾患を有する患者及び心筋梗塞又は狭心症にかかった患者をその繊維素溶解能を高めるように予防し、又は処置するための医薬の製造に使用する、請求の範囲1に従う方法。
4. ノトジンセノシドR1 (NR1) 及び／又はアストラガロシド (ASIV) のようなトリテルペンサポニン類を、低下した繊維素溶解能、又は健康な人の内毒素効果の防止のための医薬の製造にも使用する、請求の範囲1に従う方法。
5. ノトジンセノシドR1 (NR1) 及び／又はアストラガロシド (ASIV) のようなトリテルペンサポニン類を、種々の添加剤、安定化剤又は生体能力を高める物質の存在のもとにNR1又はASIVを活性物質として含む、溶液、タブレット又はカプセルの形の調剤としての医薬の製造に使用する、請求の範囲1ないし4の1つに従う方法。

【発明の詳細な説明】

ノトジンセノシド R 1 (N R 1) 及び／又はアストラ
ガルシド (A S I V) のようなトリテルペンサポニン
類を医薬の製造に使用する方法

背景

繊維素溶解系は、血管系内のみならず血管外系においても繊維素の沈積を制御する基礎的防御機構の役目をする。この繊維素溶解系の正しい機能発揮は一方において出血的現象を、そして他方において血栓的現象を防止するために、また繊維素の間質的な沈積及びそれに伴う瘢痕形成を防止するために必要である。組織プラスミノーゲンアクチベータ (t - P A) は、プラスミノーゲンを、繊維素を分解する活性プラスミンへ変えるチモーゲンの転化による (外部的) 繊維素溶解過程の開始において重要な役割を演ずると考えられている。従って更にまた、血漿の繊維素溶解能は、循環している t - P A の濃度によって大きく左右されると考えられる。血漿中の t - P A は主として血管壁に由来するものと考えられ、ここでそれはその内皮細胞の中に局在している。更に、ウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベータ (u - P A) が繊維素溶解全過程において或る役割を演じている。このプラスミノーゲンアクチベータは (少なくとも部分的に) 血管壁からももたらされるものと考えられている。繊維素溶解の主要インヒビターであるプラスミノーゲンアクチベータインヒビター 1 (P A I - 1) は内皮細胞によっても合成され、そして各 P A と P A I - 1 との相対的量割合が繊維素溶解能、また従って、例えば心筋梗塞におけるような血栓的過程の防止に対して重要であることを示す種々のデータが存在する。従って t - P A , u - P A 及び P A I - 1 の合成の薬学的制御は内因性の不十分な繊維素溶解を高めるのに有利である。

t - P A も P A I - 1 も内皮細胞によって産生されるので、これらの内皮細胞の水準面の上での合成及び分泌を制御することは血液の繊維素溶解能に影響を与えるための迅速で直接的な手段である。最近行われた研究は、種々の型の細胞の中でのプラスミノーゲンアクチベータ及びインヒビターの産生が一連の因子によって制御されることを示した。t - P A の内皮細胞の中での合成は、例えばトロ

ンビン、ヒスタミン、ブチラート、レチノール酸及び例えばホルボール-12-ミリストアート-13-アセタート(PMA)のような腫瘍促進剤等の多くの刺激物によって高められる。PAI-1の発現を制御する因子は、リポ多糖類、トロンビン、インターロイキン1(IL-1)、腫瘍壊疽因子 α (TNF α)、形質転換成長因子 β (TGF β)、基本繊維芽細胞成長因子(BFGF)及びヘパリンと組み合わせた内皮細胞成長補助物を含む。いずれにしても、上にあげた物質のいずれも生体内で用いることに成功することはできなかった。

細菌性内毒素(LPS)の有利による細菌性敗血症は生命を脅かす状態の1つであって、LPSによりもたらされる凝血及び繊維素溶解の変化が血管内凝固形成及びその結果としての器官の障害を惹起する。この場合にLPSは内皮細胞に作用を及ぼし、その際これはこのものの組織因子(TF)及びPAI-1の発現を高めると考えられている。現在、LPSにより惹起された血管内凝血の症状を呈している患者の直接の十分な処置は不可能であり、そしてLPSにより開始された、例えば過凝固のような症状の処置の手段は、一方においてヘパリンに、そしてもう一方ではその開始された細菌性敗血症の抗生物質による処置に限定されている。中国においては朝鮮にんじんPanax Notoginseng又はAstragaloseのような漢方薬草薬はすでに数千年以前から伝統的な漢方薬のうちで疼痛軽減及び鬱血並びに心臓血管の疾病の処置のために用いられていた。

実際に、例えばウィーン、ニューヨークのSpringer Verlagより1984年に刊行されたL. Zechmeisterの"Progress in the Chemistry of Organic Natural Products"第46巻の「ジンセン及び関連する植物のサポニン類」の章においてPanax notoginsengの強壮薬、止血剤、冠状動脈治療薬及び止血薬としての性質について示唆されている。同様に、"Chemical Abstracts" 119,85683には、Panax notoginsengの抗血栓作用について、そして日本国特許要約JP Kokai No. 55-127317には抗繊維素溶解作用について、また同JP Kokai No. 63-198609にはPanax notoginsengの種々の調剤にの血液灌流促進作用について示差されている。しかしながら、従来存在する刊行物のいずれにおいてもPanax notoginseng又はそれから単離された凝塊溶解作用について示唆されていない。従ってこの、Panax notoginseng又はAstragalosidの凝塊溶解作用はこ

れまでまだ全く記述されることがない。このように、内因性の繊維素溶解活性を上昇させ、或いは種々の内毒素の凝塊形成活性及び抗繊維素溶解活性に対抗的に作用する治療的に実用できる物質は知られていない。

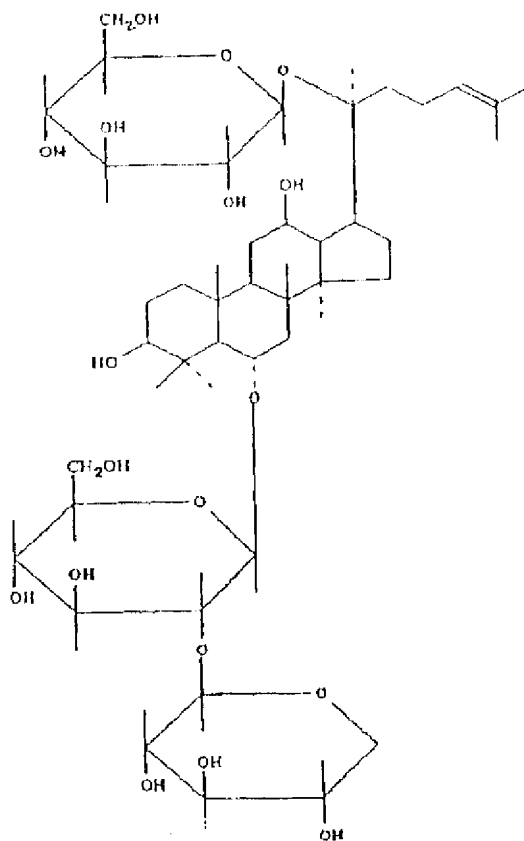
発明の一般的な記述

ここではまず第一に繊維素溶解能を上昇させ、またL P Sの効果を直接防止するために各物質を使用することを記述する。この発明の対象はノトジンセノシドR 1 (N R 1) 及び／又はアストラガロシド (A S I V) のようなトリテルペンサポニン類或いは側鎖残基及び／又はグリコシル化によってのみトリテルペンサポニン類と異なっているような化学的に近似の構造を有する物質を、精製した物質又はそれらの混合物の形で非経口的又は経口的に、繊維素溶解能を上昇させ、かつ心臓血管の疾病を防止し、そして例えば敗血性ショックにおけるような内毒素の効果を阻止するために患者を処置するように、溶液の形又はタブレット或いはカプセルの形で投与することのできる医薬の製造に使用する方法である。

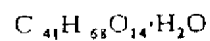
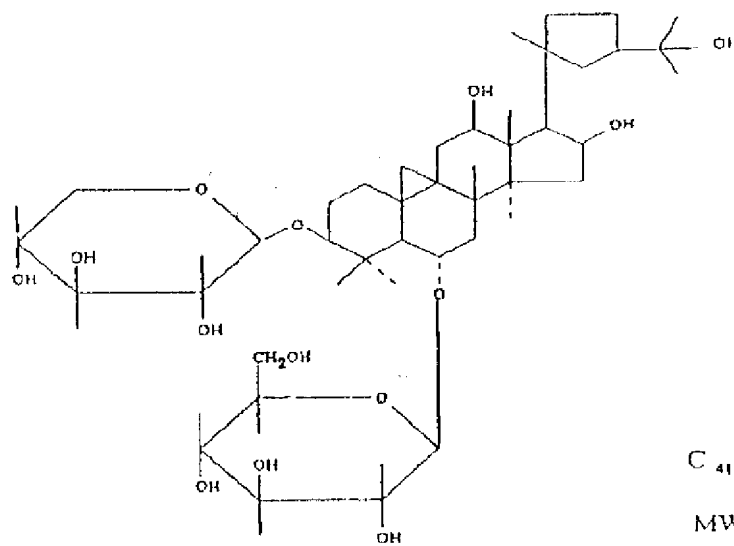
実施例

すべての実施例において下記の物質及び方法を用いた。

化学的に純粋なノトジンセノシドR 1 (N R 1) 又は化学的に純粋なアストラカロシド (A S I V) は中国、北京の、薬学的及び生物学的生産物の制御のための国立研究所より購入した。N R 1 又はアストラガロシド A S I V は下記式を有する物質である。



ノトジンセノシド R1



MW 802

アストラガロシド IV

NR1又はASIVは、0.01ないし100 μ g/mlの最終濃度に達するようにインキュベーション媒質の中に溶解して希釈した。フェノール抽出によって調製し

たりポ多糖類 (Escherichia coliリポ多糖類、抗原型026:B6) はSigma社 (米国ミズーリ州セントルイス) より入手した。蒸留水中、1 ml当たり 1 mgの濃度を有する溶液を-70℃において貯蔵した。モルホリノプロパンスルホン酸 (ドイツ国Serva社)、グアニジンチオシアナート (スイス国Fluka社)、ピペラジン-N,N'-ビス (2-エタンスルホン酸) (PIPES; Sigma社)、Seakem LEアガロース (米国メイン州、FMC Bioproducts社)、dCTP [Aloha-32P] (米国カリフォルニア州、ICN Radiochemicals社) はそれぞれあげた会社から入手した。それぞれの方法において記述される他の諸物質は対応する引用文の中に詳細にあげてある。

細胞培養

内皮細胞を、Jaffe等により” J. Clin. Invest.” (1973), 52, 2745-56に記述されたプロトコルと同様にして新鮮なヒト臍帯静脈からコラーゲナーゼ (Sigma社) により分離した。4-6個の臍帯からの細胞をプールしておき、そして子牛獣皮からの1%のゼラチン (Sigma社) で被覆された75cm²の細胞培養フラスコ (米国ミネソタ州、Costar社) の中に播種した。それらの細胞を、加熱滅菌した補充された20%の子牛血清 (SCS: 米国ユタ州、Hyclone社)、100 µg/mlのストレプトマイシン、100 IU/mlのペニシリン、250 ng/mlのFungizon、1 mMのグルタミン (米国カンザス州、JRH Biosciences社)、2 IU/mlのヘパリン (Liquemin Roche: スイス国、Hoffmann La Roche社)、50 µg/mlのECGS (オーストリア国、Technoclone社) を添加した培地199 (Sigma社) の中で、水蒸気飽和した95%の空気と5%のCO₂とよりなる雰囲気の中で37℃において集密点 (Konfluenz) まで培養した。それら細胞の内皮的特性はそれらの典型的な玉石形状、抗-フォンウィルブラント因子VIII抗体による蛍光抗体試験法における陽性、及びアセチル化した低密度リポ蛋白質 (LDL) の取り込みによって確認した。初代培養物を集密の時点において0.05%トリプシン/0.02%EDTA (JRH Biosciences社) を用いて捕集し、そして1:3のスプリット比で75cm²の細胞培養フラスコの中に播種した。集密

点以前の細胞は同じ条件のもとで集密点に達するまで培養して対数曲線的細胞増殖期においてトリプシン/EDTAにより捕集し、そして10%ジメチルスルホキシド

(DMSO)を含む培地199の中に各1mlの部分量ずつ液体窒素の中で凍結させた。実験のために各細胞を37℃において解凍し、そしてSCS、ECGS及びヘパリンを上にあげた濃度で加えた培地199の中で6窪板(直径3.5cm、Costar社)の中で集密点に達するまで培養した。全ての実験において各細胞は第2過程と第3過程との間で用いた。それら細胞にはそれぞれの実験の前の日に新鮮な培地を供給した。細胞培養に用いた全ての物質はCoatest内毒素キット(スウェーデン国、Kabi Vitrum社)によって内毒素が存在しないことを確認した(試験の検出限度=5 pg/ml)。

ならし培地(CM)及び細胞外母質(ECM)の調製

集密点に達した培養物をハックス平衡塩類溶液(HBSS:Sigma社)で2回洗浄し、そして37℃において、窪1個当たり1mlの、1.25%のSCSと50 µg/mlのECGSとを加えた培地199によりNR1又はASIVとともに上記したそれぞれの濃度においてインキュベートした。このインキュベーションの後でその細胞培養上澄液を集めて遠心分離(細胞破片を除去するため)の後、-70℃において使用まで貯蔵した。対応する各培養物の全細胞数はトリプシン処理の後で血球計数板を用いて求めた。これら又は類似的に処理した培養物のECMはMimuro等: "Blood" (1987), 70, 721-28の方法に従って調製した。その単分子層を燐酸塩で緩衝された冷たい食塩溶液(PBS: 燐酸ナトリウム0.01M、NaCl 0.14M、pH7.4)で3回洗浄し、そして各細胞性成分を、0.5%トリトンX100を加えたPBSで37℃において10分間インキュベーションすることによって抽出した。各板をもう一度蒸留水で洗浄して残存する細胞性成分を除去し、そして次に細胞破片の存在について顕微鏡検査により調べた。この抽出方法によって可視的細胞破片はそれぞれの板から完全に除去され、そしてECMは30分間のインキュベーションの後で37℃において、0.1%のSDSを加えた1mlのPBSの中へ掻き取りによって抽出した。この抽出物を1夜4℃においてPBSに対して透析した。

CM、ECM及び血漿の中でのtPA抗原、uPA

抗原、PAI-1抗原、PAI-1活性及びtPA

／PAI-1複合体についての試験

t P A 抗原、u P A 抗原、P A I - 1 抗原及びt P A / P A I - 1 複合物の濃度を、市販で入手できる酵素と結合したイムノソルベント分析法（エリザ法）（Technoclone社）により、メーカーより添付された案内書に従い求めた。これらの試験についての試験領域はt P A については0.3ないし2.5ng/mlであり、u P A については0.6ないし10ng/mlであり、P A I については1.0ないし30ng/mlであり、そしてtPA/PAI-1複合物については0.2ないし20ng/mlである。t P A エリザ法により、遊離のt P A 及びP A I - 1 との複合物の中のt P A が求められた。u P A エリザ法によって、遊離のu P A 及びP A I - 1 との複合物の中のu P A を決定した。P A I - 1 エリザ法により、遊離の、複合化した、及び潜在するP A I - 1 が測定される。t P A / P A I - 1 複合物エリザ法は専らt P A / P A I - 1 複合物の測定に用いられる。血漿の中及びC M 中のP A I - 1 活性は滴定分析法（Technoclone社）により、そしてメーカーから添付された案内書に従って求めた。

t P A 及びP A I - 1 の機能的活性の決定

t P A 及びPAI-1の活性はナトリウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S - P A G E）に従い、繊維素オートグラフィー（F A）及び逆繊維素オートグラフィー（R F A）の使用のもとに分析した。S D S ポリアクリルアミドゲル及び緩衝液はLaemmli: "Nature" (1970), 227, 680-85のプロトコルに従って作った。F A はGranelli-Piperno等: "J. Exp. Med." (1978), 148, 223-34と同様に実施した。それぞれの対応する試料100 μ lを10cmの長さの、10%のアクリルアミドを含む分解用ゲルと2cmの長さの、4%のアクリルアミドを含む重ねゲルとよりなるゲルの上に導入し、そして室温において16時間、又は着色前縁がゲルの下縁に達するまで進行させた。この電気泳動の後でそれらゲルをまず最初、S D S を中和するために2.5%のトリトンX100（Serva社）を加えた250mlの水の中に90分間置き（このトリトン溶液は45分間の後に取り替えた）、次にそれらゲルを1.5%のタイプL

アガロース（ドイツ国、Behring社）、プラスミノゲンに富んだ2mg/mlのフィブリノーゲン（オランダ国、Organon Technika社）及び0.2IU/mlの牛トロニン

(Sigma社)の含まれた繊維素／寒天／指示薬フィルムの上に置いた。それらのゲルを37℃において湿潤した室の中でインキュベートし、そして種々異なった時間に写真撮影した。RFAは各ゲルを、基本的に上述のようにして作ったが追加的に0.4IU/mlのウロキナーゼ(Technoclone社)を含んでいる繊維素フィルムの上に置いた。或る特定の試料の中のtPA及びPAI-1の活性の定量はその指示薬フィルムの上の溶解帯域のみならず溶解抵抗性帯域をも写真撮影するようにして達成された。これらの帯域は透明紙の上に記録してその描かれた面積を切り離し、そして分析用天秤の上で秤量した。

各HUVECののに含まれているプラスミノーゲンアクチベータを免疫学的に同定するために、CMの各試料を4℃においてCNBrで活性化させたセファローズに結合させたモノクローナル抗tPA抗体(MPW3VPA:Technoclone社)とともに、又はモノクローナル抗uPA抗体(MPW5UK:Technoclone社)とともに、或いは対照群としてセファローズ4B(スウェーデン国、Pharmacia社)とともに24時間インキュベートした。次にセファローズを遠心分離によって除去し、そしてその対応する試料の100 μ lを上記のSDS-PAGE及び引き続くFAにより分析した。

細胞溶解物の調製及びTF活性の測定

LP S及び／又はNRIを含む培地199の中で各HUVECを37℃において6時間インキュベートした。それらの細胞を凝固用緩衝液(NaCl 130mM、Na-バルビタール8mM及びNa-アセテート12mM、pH=7.4)で3回洗浄し、そして掻き取りによって300 μ lの凝固緩衝液の中に取り込んだ。それら掻き取られた細胞を凍結し、そして解凍させた。細胞溶解物を1段階凝固アセイ法でTF活性について試験した。この細胞培養液100mlを20mMのCaCl₂の100 μ lとともに37℃において予め温めておいたプラスチックチューブの中で5分間にあたりコアギュロメータ(ドイツ国、H. Amelung GmbH社)の中でインキュベートした。凝固を、予め温めておいた正常な人のクエン酸血漿100 μ lの添加により、又は因子X欠陥血漿(Sigma社)の添加によって開始させた。

TF活性は家兎脳トロンボプラスチン(Sigma社)を用いて作った標準曲線(log

/logプロット)を用いて定量した。100mUの活性は正常ヒト血漿を用いた標準試験における20秒間の凝固時間として定義された。観測された凝固活性がTF活性に相当し、というのは因子X欠陥血漿を正常血漿の代わりに用いた場合に内皮細胞のプロ凝固活性が全く認められなかったからである。

ノーザンブロット分析法によるtPA、PAI-1及びTFの

mRNA量の定量

内皮細胞からの全細胞RNAをChomzynsky及びSacchi: "Anal. Biochem." (1987), 162, 156-9に記述された酸性グアニジンチオシアナート/フェノール/クロロホルム抽出によって分離した。このRNA沈殿を50 μ lの0.5% SDSの中に再分散させ、そしてその濃度を260nMに設定した。ノーザンブロット分析法のために各RNA試料を1.2%のアガロースゲルで電気泳動処理し、それにより分離されたRNAをDuralon-UVTM膜(米国カリフォルニア州、Stratagene社)の上に毛管作用により移した。各RNAのプロットをシールアミール(seal-a-meal)バッグの中に包み込んで5% SDSを加えた50mMのPIPES、100mMのNaCl、50mMのNa-燐酸塩、1mMのEDTAの中で57℃において少なくとも3時間にわたり予備ハイブリダイゼーションさせた。その予備ハイブリダイゼーション緩衝液を捨て、そしてヒトtPA、ヒトPAI-1、ヒトTF又は内部標準ゾンデとして用いたラットグリセルアルデヒド-3-燐酸デヒドロゲナーゼのそれぞれについて32Pで標識したcDNAゾンデの106CPM/mMを加えた新しい予備ハイブリダイゼーション緩衝液で置き換えた。各cDNA断片をRandom Prime DNA Labelling Kit(ドイツ国、Behringer Mannheim社)により放射能活性的に標識した。

動物実験

この研究においては専ら雄のBALB/cマウス(体重18-30g)のみを用いた。全ての実験はエーテル麻酔のもとに実施した。各マウスに、尾静脈を介してLPS(10ng/g)及び/又はNR1(1 μ g/g)を5 μ g/lの容積で静脈注射した。それぞれ記載した時点においてクエン酸ナトリウム(最終濃度0.13M)で抗凝集化させたそれぞれの血液試料を採取した。血小板を含まない血漿を30

分間にわたる2500Gでの遠心分離により4℃において採集し、そして-70℃にお

いて試験まで保存した。

人におけるNR1含有抽出物の投与

24時間の間に $4 \times 100\text{mg}$ 当量のノトジンセンR1 (NR1)を含む抽出物を6人の任意の健康な基員において投与した。最初の投与の直前及び最後の投与の直後にそれぞれ血液採取を行った。これらの血液試料において上記の方法と同様にしてプラスミノーゲンアクチベーター1 (PAI-1) 抗原、組織プラスミノーゲンアクチベーター (tPA) 抗原及びウロキナーゼープラスミノーゲンアクチベーター (uPA) 抗原のそれぞれの含有量を求めた。

統計的分析

結果は平均値±標準偏差としてあげてある。シグニフィカンスを確認するために非対のスチューデントt-検定を用いた。

例1 培養したヒト請静脈内皮細胞中のtPA、uPA及びPAI-1の産生に対するNR1の効果

培養したHUVECにおけるtPA抗原(領域A)、
tPA/PAI-1複合物(領域B)及びPAI-1抗原(領域C)の産生に対するノトジンセンR1 (NR1)の効果

いくつかのHUVECを種々の濃度のNR1 ($0.01\text{--}100\mu\text{g/ml}$) とともに24時間にわたりインキュベートし、そしてそのCMをtPA抗原、PAI-1抗原及びtPA/PAI-1複合物について、物質及び方法のところで記述したと同様に試験した。結果はそれぞれ3重に行った3つの実験の平均値である。各値は平均値±標準偏差として図1に示してある。シグニフィカンスは対照群と比較してあげてある (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。図1Aに示すように、次第に上昇する濃度のNR1によるHUVECの24時間にわたる処置はそのような類の処理された細胞のCMの中のtPA抗原の投与量に依存する上昇をもたらした。 $100\mu\text{g/ml}$ NR1により最大の効果に達した (100mg/ml NR1 : $9.6 \pm 0.7\text{ng}/105\text{個の細胞}/24\text{時間}$ 、対照群 : $5.8 \pm 0.4\text{ng}/105\text{個}/24\text{時間}$ 、 $n=9$ 、 $p < 0.05$)。図1Bに示すように、次第に上昇する濃度の

N R 1 の存在のもとでC M中のt P A / P A I - 1 複合物も同様に上昇した ($100 \mu\text{g/ml}$ N R 1 : $63.5 \pm 2.6 \text{ ng} / 105 \text{ 個の細胞} / 24 \text{ 時間}$ 、対照群 : $40.2 \pm 7 \text{ ng} / 105 \text{ 個の細胞} / 24 \text{ 時間}$ 、 $n=9$ 、 $p<0.01$)。

培養したH U V E CのE C Mの中のP A I - 1 抗原産生
に対するノトジンセノシド (N R 1) の効果

いくつかのH U V E Cを種々の濃度のN R 1 ($0.01-100 \mu\text{g/ml}$) とともに24時間にわたりインキュベートした。そのE C Mを、物質及び方法のところで記述したと同様に採取し、そしてP A I - 1 抗原について試験した。それらの値は6つの独立の窪からの平均値 \pm 標準偏差である。N R 1で処理したH U V E CのC Mの中及びE C Mの中のP A I - 1 抗原は対照群に比してそれほど大きくは変化しなかった (C M : $100 \mu\text{g N R 1} / \text{ml}$: $2.92 \pm 0.32 \mu\text{g} / 105 \text{ 個の細胞} / 24 \text{ 時間}$ 、対照群 : $2.78 \pm 0.45 \mu\text{g} / 105 \text{ 個の細胞} / 24 \text{ 時間}$ 、 $n=9$ 、E C M : $100 \mu\text{g/ml}$ N R 1 : $42.55 \pm 3.15 \text{ ng} / 24 \text{ 時間}$ 、対照群 : $42.27 \pm 1.66 \text{ ng} / \text{ml} / 24 \text{ 時間}$ 、 $n=6$) (図 1 C、図 2)。

ノトジンセノシドR 1 (N R 1) による処理の後の培養
したH U V E Cのt P A 抗原 (領域A) 及びP A I - 1
抗原 (領域B) の産生の時間的経過 (図 3)

いくつかのH U V E Cをそれぞれ記載した時間にわたり、N R 1 の非存在のもとに (白丸)、又はその $100 \mu\text{g/ml}$ の存在のもとに (黒丸) インキュベートした。それぞれ記載した時点において対応するC Mを採取し、そしてt P A 抗原及びP A I - 1 抗原について、物質及び方法のところで記述したと同様にして試験した。それぞれの結果はそれぞれ3重に行った3つの実験の平均値である。各値は平均値 \pm 標準偏差であり、対照群と比較して $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ であげてある。図3に示すように、 $100 \mu\text{g/ml}$ N R 1でそれぞれ6、12又は24時間にわたり処理した各H U V E Cの中のt P A 抗原は対照群に比して時間依存的に上昇し、これに対してそのような類の処理された細胞のC Mの中のP A I - 1 抗原はあまり大きくは変化しなかった。

ノトジンセノシドR 1は、培養したH U V E Cのu P A 抗原分泌に影響を及ぼす。

100 μ g/ml NR 1 の存在のもとにインキュベートした各 H U V E C の C M を u P A 抗原について試験したときに、これらの細胞により産生された u P A 抗原の量が、対照群の条件のもとで培養した各 H U V E C の C M に比して重大に変化することが見出された (100 μ g/ml NR 1 : 2.9 ± 0.6 ng / 106個の細胞 / 24時間、対照群 : 2.5 ± 0.8 ng / 106個 / 24時間、n=9)。

例 2 培養したヒト請静脈内皮細胞の中の t P A 活性

及び P A I - 1 活性に対する NR 1 の効果

ノトジンセノシド R 1 は培養した H U V E C の中の t P A 活性を上昇させ、そして P A I - 1 活性を低下させる。H U V E C の C M 試料の繊維素オートグラフィー (F A) : (図 4)

いくつかの H U V E C の C M を 24 時間後に捕集し、そして S D S - P A G E 及び引き続いての P A によって、物質及び方法のところで記述したと同様にして試験した。レーン 1 : 各 H U V E C の非処理の C M 、レーン 2 : セファロースに結合させたモノクローナル抗 t P A 抗体とともに予備インキュベートした各 H U V E C の C M 、レーン 3 : セファロースに結合させたモノクローナル抗 u P A 抗体とともに予備インキュベートした各 H U V E C の C M 、レーン 4 : セファロース 4 B とともに予備インキュベートした各 H U V E C の C M 、レーン 5 : 精製したヒト t P A 、レーン 6 : 精製したヒト u P A 。24 時間にわたり対照群の条件のもとでインキュベートした各 H U V E C から得られた C M を S D S - P A G E 及び引き続く F A により分析したときに、70,000 又は 120,000 の明瞭な分子量を有する 2 つの主要な溶解帯域が見出された。これらの溶解帯域はモノクローナル抗 t P A 抗体を用いての予備インキュベーションによっては除去できなかったけれども、モノクローナル抗 u P A 抗体を用いての予備インキュベーションによって除去できた (図 4) 。従ってこの溶解帯域は 70kDa における遊離の t P A によりもたらされたものであり、そして P A I - 1 との複合物の中の t p A によってそのより分子量の高い方の溶解帯域がもたらされたものであることを結論することができる。

培養された各 H U V E C の中の t P A 活性及び t P A / P A I - 1

複合物と組み合わされた活性（領域A）及びPAI-1活性に対する（領域B）繊維素オートグラフィー（FA）及び逆繊維素オートグラフィー（RFA）を用いた分析によるノトジンセノシドR1（NR1）の効果（図5）

集密状態のHUVECを種々の濃度のNR1（0.001-100 μ g/ml）を用いてインキュベーションした後でそのCMをSDS-PAGE及び引き続くFA又はRFAにより、物質及び方法のところで記述したと同様に処理した。これらの図における溶解帯域及び溶解抵抗性帯域を透明紙の上に移し、切り抜いて分析用天秤の上で秤量した。これら透明紙の重量をNR1の濃度に対してプロットした（下方の部分）。各データはそれぞれ独立の、類似の結果を示した3つの実験の結果である。レーン1：対照群、レーン2：0.01 μ g/ml NR1、レーン3：0.1 μ g/ml NR1、レーン4：1.0 μ g/ml NR1、レーン5：10 μ g/ml NR1、レーン6：100 μ g/ml NR1。NR1を含まないか、又はこれを次第に上昇する濃度で含んで24時間培養した各HUVECのCMをFA又はRFAで分析したときに、溶解帯域の大きさの投与量に依存する上昇を確認することができたが、これに対して、溶解抵抗性帯域の大きさはNR1の量の上昇とともに減少した（図5A及びB）。溶解帯域又は溶解抵抗性帯域の大きさを、物質及び方法のところで記述したと同様に定量したときに、そのtPAに依存する溶解の3倍までに達する上昇を確認することができたが、これに対して、PAI-1に依存する溶解抵抗性は対照群に比して100 μ g/ml NR1の存在において20%に低下した（図5A及びB）。

例3 培養したヒト静脈内皮細胞の中のtPA及び

PAI-1のmRNAに対するNR1の効果

いくつかのHUVECにおけるtPA及びPAI-1のmRNA

発現に対するノトジンセノシドR1（NR1）の効果

集密状態におけるHUVECをNR1の非存在のもとで（C）又は存在（100 μ g/ml）のもとに（T）12時間にわたりインキュベートした。非処理の、及びRN1で処理した各HUVECのRNA抽出物のノーザンブロット分析法を32P

で標識したいくつかの cDNA-ゾンデを用いて tPA、PAI-1 及び GAPDH の mRNA について実施した。オートラジオグラムの上に存在するバンドの強度をデンシトメトリーにより評価し、そして tPA 又は PAI-1 に対する特異的 mRNA を、負荷量の差を補償するために GAPDH-mRNA に対して標準化した。信号強度を、非処理の対照群細胞からの信号に比しての NR1 で処理した各 HUVEC の信号の割合として比較した。これらのデータは類似の結果を示した 2 つの独立の実験の結果を表わす。図 6 に示すように、NR1 の各 HUVEC の中の tPA の分泌に対する刺激効果はその特異的 mRNA 発現の水準にも反映されていた。tPA 特異的 mRNA は $100 \mu\text{g/ml}$ の NR1 で 12 時間にわたり処理した HUVEC においては 2 倍の値にまで上昇したが、これに対し、PAI-1 に特異的な mRNA の発現は NR1 によっては制御されなかった (3.2kb: 対照群の 82% 値 2.2kb: 対照群の 86%)。 $10 \mu\text{g/ml}$ のシクロヘキシミドの存在のもとにノーザンブロット分析法の試験を行った場合には、NR1 の tPA 特異的 mRNA に対する刺激効果が阻止された (データは示していない)。

例 4 試験管内での PAI-1 抗原、活性及び PAI-1
 の mRNA の、内毒素によりもたらされる制御作用
 に対する NR1 の効果

図 7 に示すように、各細胞の LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) による 12 時間の処理によってもたらされる PAI-1 抗原の制御は、種々異なった濃度の NR1 により同時に処理することにより拮抗される。この拮抗作用の大きさはその NR1 濃度 ($0.1-100 \mu\text{g/ml}$) について投与量依存性であり、そして LPS によって惹起された PAI-1 抗原の増加はそれら細胞の $100 \mu\text{g/ml}$ NR1 による共インキュベーションにより重大に低下した (対照群細胞: $347 \pm 34\text{ng}/105$ 個の細胞/12 時間、LPS で処理した細胞: $946 \pm 42\text{ng}/105$ 個の細胞/12 時間、LPS 及び NR1 で処理した細胞: $469 \pm 29\text{ng}/105$ 個の細胞/12 時間)。各細胞の PAI-1 活性の変化は PAI-1 抗原の変化に対して平行していた (対照群細胞: $5.48 \pm 0.78\text{U}/105$ 個の細胞/12 時間、NR1 で処理した細胞: $4.77 \pm 0.26\text{U}/105$ 個の細胞/12 時間、LPS 及び NR1 で処理した細胞: $4.77 \pm 0.26\text{U}/105$ 個の細胞/12 時間)。

胞： $4.77 \pm 0.26 \text{ U} / 105 \text{ 個の細胞} / 12 \text{ 時間}$ 、 $n=6$ ）。P A I - 1 の m R N A は $1 \mu \text{ g} / \text{ml}$ L P S 及び／又は $100 \mu \text{ g} / \text{ml}$ N R 1 で処理した細胞において測定した。P A I - 1 に特異的な m R N A の量（3.2kb）の、L P S により引き起こされた2倍までの上昇はL P S の存在のもとでのみならずN R 1 の存在のもとでも1.37倍の上昇に低下した（図8）。

例5 試験管内でのP A I - 1 活性の、L P S により惹起
される制御に対するN R 1 の効果

試験管内のいくつかの研究はマウスにおけるL P S の注入が血漿／P A I - 1 活性の迅速な上昇をもたらすことを示した。 $10 \text{ ng} / \text{g}$ （体重）のL P S の投与によって注入の2時間後に対照群の値を7倍までに超える重大な上昇を確認することができたが、最高値には注入の4時間後に達した。より後の時点においてそのP A I - 1 活性はゆっくりと正常値にもどった。これに対して、同時的にL P S とN R 1（ $1 \mu \text{ g} / \text{g}$ ）とで処理した動物においてはそのP A I - 1 活性は注入の4時間後に照合群の値に戻った（L P S で処理した群： $11.3 \pm 3.1 \text{ H} / \text{mL}$ 、L P S とN R 1 とで処理した群： $4.3 \pm 1.0 \text{ U} / \text{mL}$ 、対照群： $4.9 \pm 0.3 \text{ U} / \text{mL}$ 、 $n=5-8$ ）（図9）。

例6 培養したH U V E C における内毒素（L P S ）に
よりもたらされるT F 活性及びm R N A の誘導に
対するN R 1 の効果

非処理のH U V E C においては非常にわずかな量のT F 活性しか見出されなかった（ $0.78 \pm 0.15 \text{ mU} / 106 \text{ 個の細胞}$ 、 $n=9$ ）。このT F 活性はL P S による処理（ $1 \mu \text{ g} / \text{ml}$ 、6時間）によってH U V E C の中で $88.6 \pm 6.5 \text{ mU} / 106 \text{ 個の細胞}$ （ $n=6$ ）の値に上昇した。 $1 \mu \text{ g} / \text{ml}$ のL P S で6時間処理した後に測定したH U V E C の中のT F 活性は、同様にN R 1 による共インキュベーションによって大きく拮抗された（L P S とN R 1 とで処理した細胞： $56.0 \pm 1.9 \text{ mU} / 106 \text{ 個の細胞}$ ）。この拮抗作用の大きさはN R 1 濃度に関して同様に投与量に依存したが、その際 $100 \mu \text{ g} / \text{ml}$ のN R 1 によって約36.8%の阻害に達した（図10）。T F の m R N A の重大な上昇がL P S によるH U V E C の処理によって観測され、これは2時間後で照合値を9倍超える上昇（ $2.4 \pm 3.1 \pm 3.5$

kb)に達した。LPSによって高められたTF-mRNAの値はNR1との共インキュベーションにより同様に拮抗された。TF-mRNA値は対照群を約4倍超える値に低下した。細胞を100 μ g/mlのNR1だけで処理した場合に、そのTF-mRNAの値は対照値の40%に低下した(図11)。

例7 ヒト内皮細胞培養物におけるtPA及びPAI-1の

抗原的濃度に対するアストラガメシドの作用

培養したHUVECにおけるtPA抗原及びPAI-1抗原

の産生に対するアストラガロシドIV(ASIV)の効果

HUVECを種々の濃度のASIV(0.01-100 μ g/ml)とともに24時間にわたりインキュベートし、そしてそのCMを、物質及び方法のところで記述したと同様にtPA抗原及びPAI-1抗原について試験した。それぞれの結果はそれぞれ3重に行なった3つの実験の平均値である。それらの値は平均値 \pm 標準偏差として図12及び13に示してある。シグニフィカンスは対照群と比較してあげてある(*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001)。図12に示すように、各HUVECを、次第に上昇する濃度のASIVを用いて24時間処理した場合に、そのように処理された細胞のCMの中のtPA抗原の投与量に依存する上昇がもたらされた。100 μ g/mlのASIVにより最高の効果に達した。

図13は培養した種々のHUVECの中でのPAI-1抗原産生に対する効果を示す。HUVEC(図13)は種々異なった濃度のASIV(0.01-100 μ g/ml)とともに24時間インキュベートした。そのCMは、物質及び方法のところで記述したと同様に捕集してPAI-1抗原について試験した。それぞれの値はそれぞれ3重に行なった3つの実験からの平均値 \pm 標準偏差である。ASIVで処理したHUVECのCMの中の抗原は対照群に比して重大に変化した。

例8 ヒト内皮細胞の中のtPA及びPAI-1のメッ

センジャーリボ核酸(mRNA)に対するアスト

ラガロシドの作用

HUVECにおけるtPA及びPAI-1のmRNA発現に対する

アストラガロシドASIVの効果(図14)

集密状態におけるH U V E Cを、それぞれ6、12及び24時間にわたりA S

I Vの非存在のもとで、又はその存在(100 μ g/ml)のもとでインキュベートした。非処理のH U V E C及びA S I Vで処理したH U V E CのR N A抽出物のノーザンブロット分析を32Pで標識したいくつかのc D N A-ゾンデを用いてt P A、P A I-1及びG A P D Hのm R N Aについて行なった。オートラジオグラムの上に存在しているバンドの強度をデンストメトリーによって評価し、そしてt P A又はP A I-1に対する特異的m R N Aを、負荷量の差を補償するためにG A P D Hのm R N Aに対して標準化した。信号強度は非処理対照群細胞の信号と比較しての、N R 1で処理したH U V E Cの信号の割合として比較した。これらデータは、類似の結果を示した2つの独立の実験の結果を表わす。図14に示すように、H U V E Cにおける、A S I Vのt P A分泌に対する刺激効果及びP A I-1分泌に対する阻害効果は特異的m R N A発現の水準にも反映されていた。

例9 内毒素で処理した内皮細胞培養物におけるP A I-1
及び組織因子発現に対するアストラカロシテドA I V
の作用

図15に示すように、それら細胞を種々の濃度でL P Sで12時間にわたり処理することによりもたらされたP A I-1抗原の制御はA S I Vによる同時的処理によって大きく低下する(**p<0.01、***p<0.001)。この拮抗作用の大きさはA S I Vの濃度(0.1-100 μ g/ml)に関して投与量依存性であった。それら細胞のP A I-1活性の変化はP A I-1抗原の変化と平行であった(データは示していない)。図16は内毒素により惹起された組織因子(T F)のH U V E Cにおける発現に対するA S I Vの効果を示す。A S I VはL P Sにより誘発されるT F制御をほとんど完全に拮抗する。

T Fのm R N Aの重大な上昇がL P SによるH U V E Cの処理の後で観測された。L P Sにより高められたT Fのm R N Aの値はA S I Vとの組み合わせにより類似的な態様で拮抗された(図17)。

例10 ヒトにおけるノトジンセンR 1の含まれた種々の

抽出物の繊維素溶解活性に対する作用

図18、19及び20には、健康な基員におけるtPA、PAi及びuPAに対するNR1含有抽出物の効果があげられている。tPAの上昇及びPAI-1の低下がもたらされ、これは組織培養におけるNr-1又はASIVの効果に相当する。

【 図 1 】

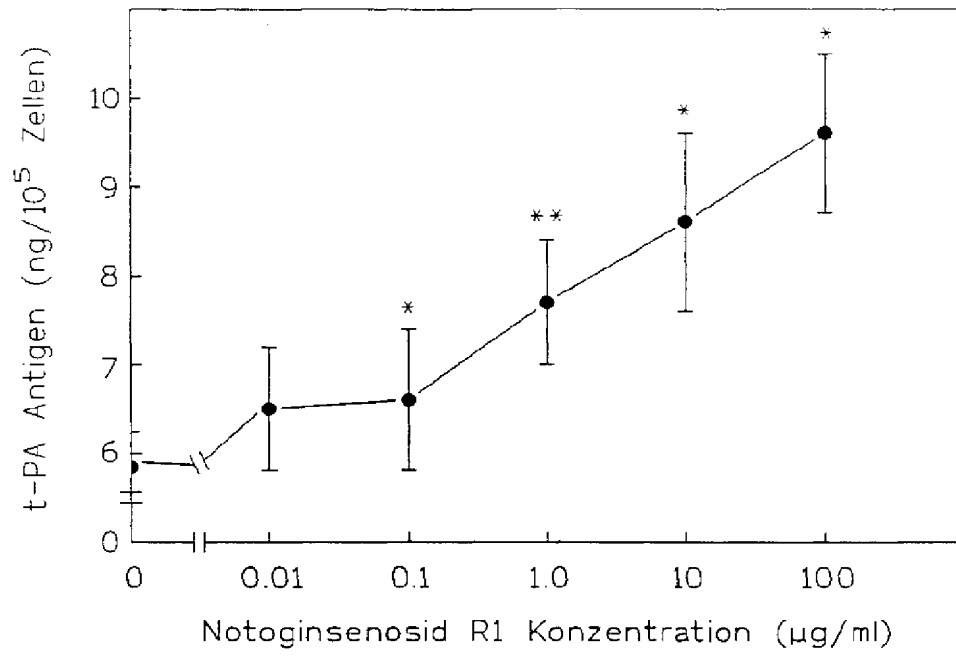


Fig.1A

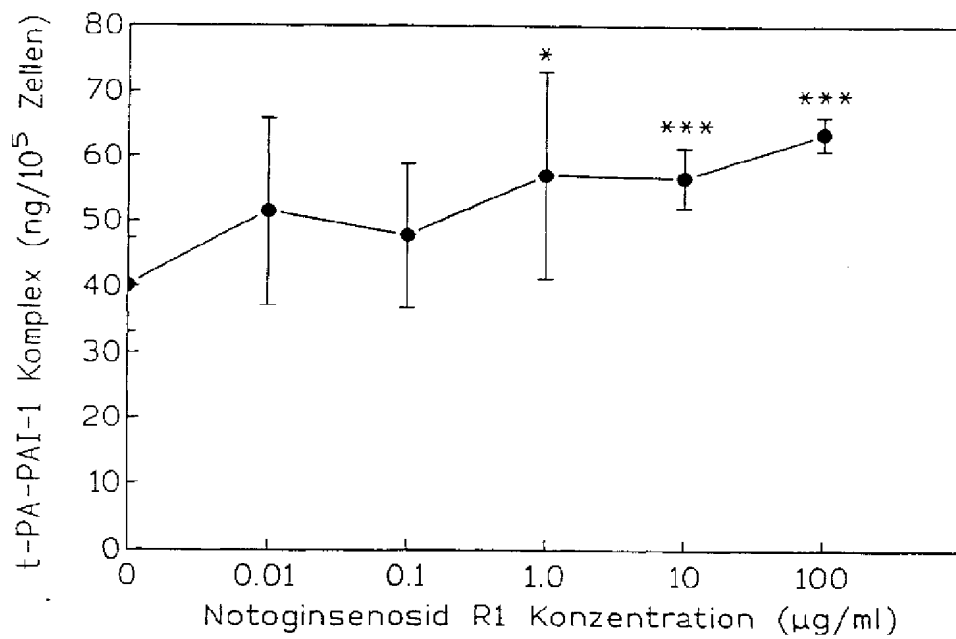


Fig.1B

【 図 1 】

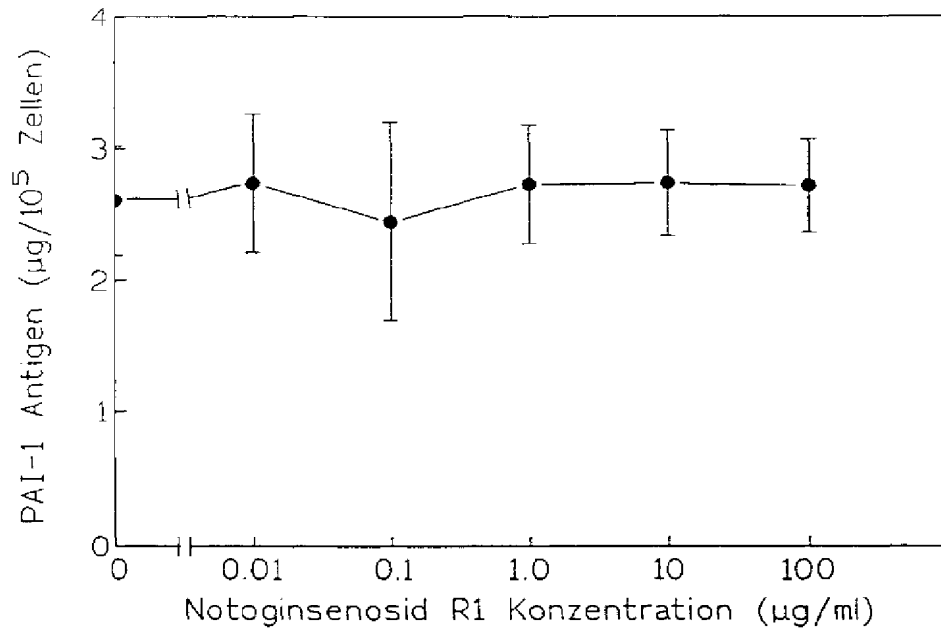


Fig.1C

【 図 2 】

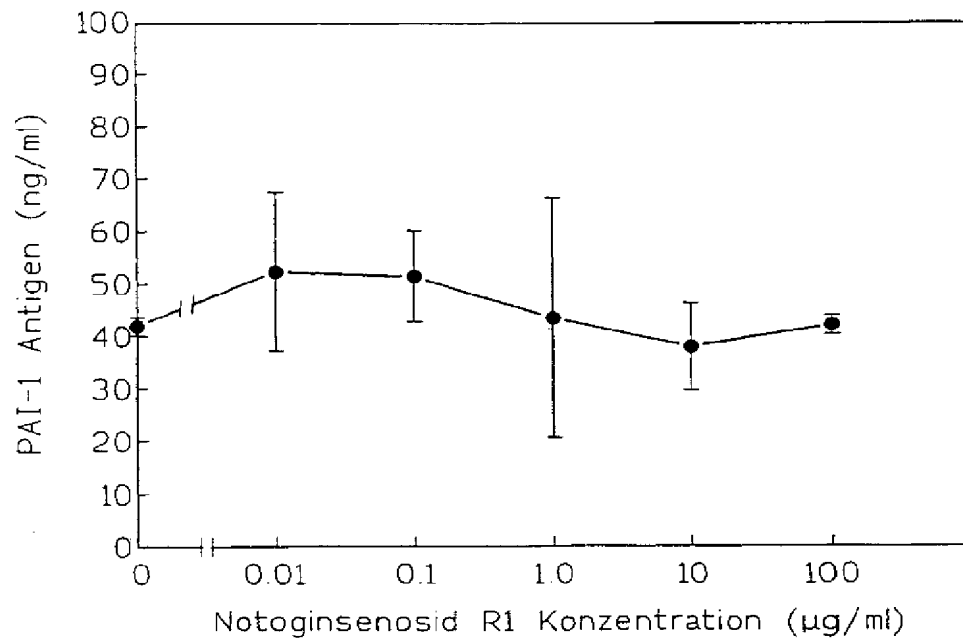


Fig.2

【図3】

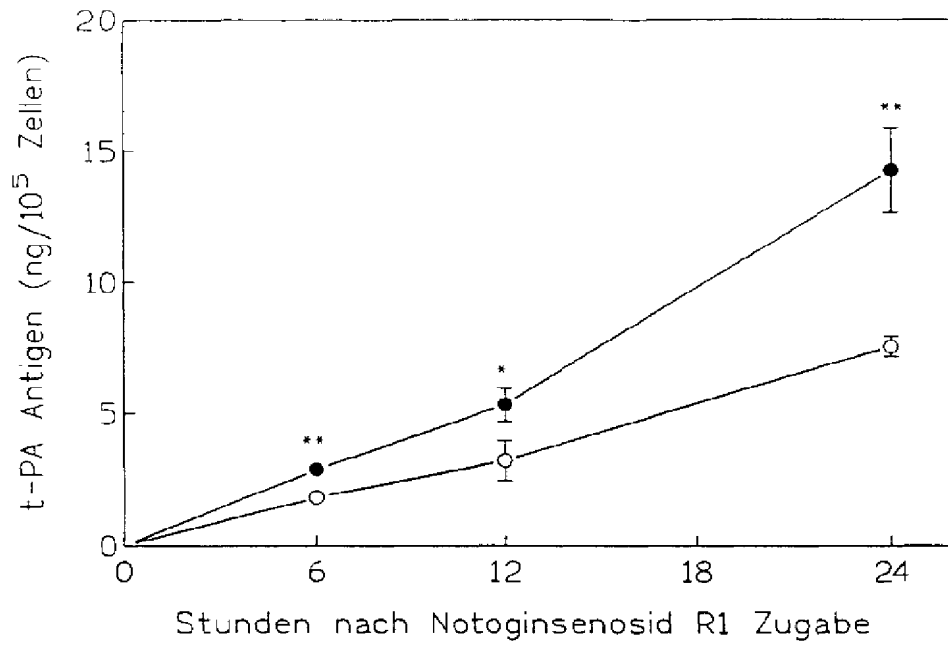


Fig.3A

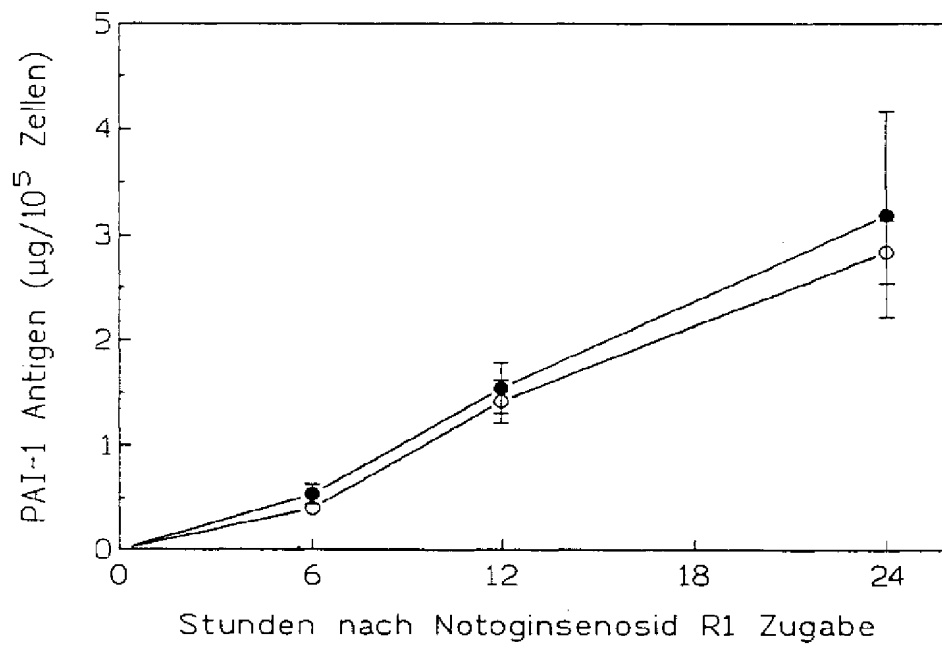


Fig.3B

【 図 4 】

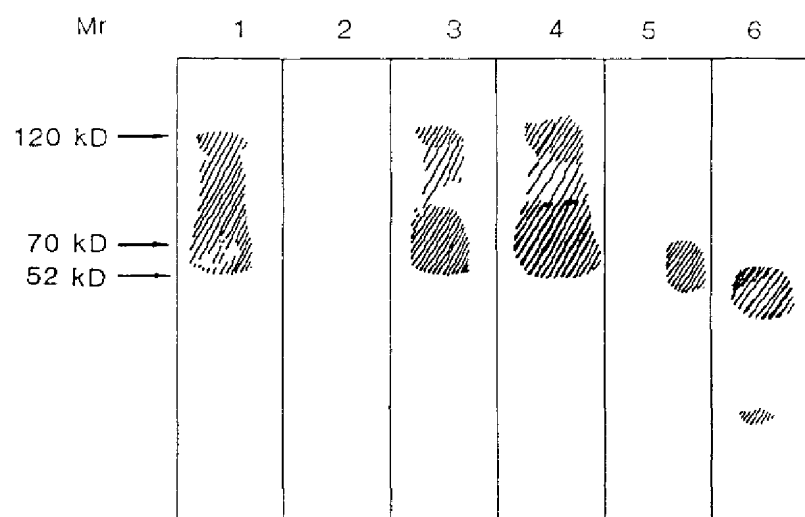


Fig.4

【 図 6 】

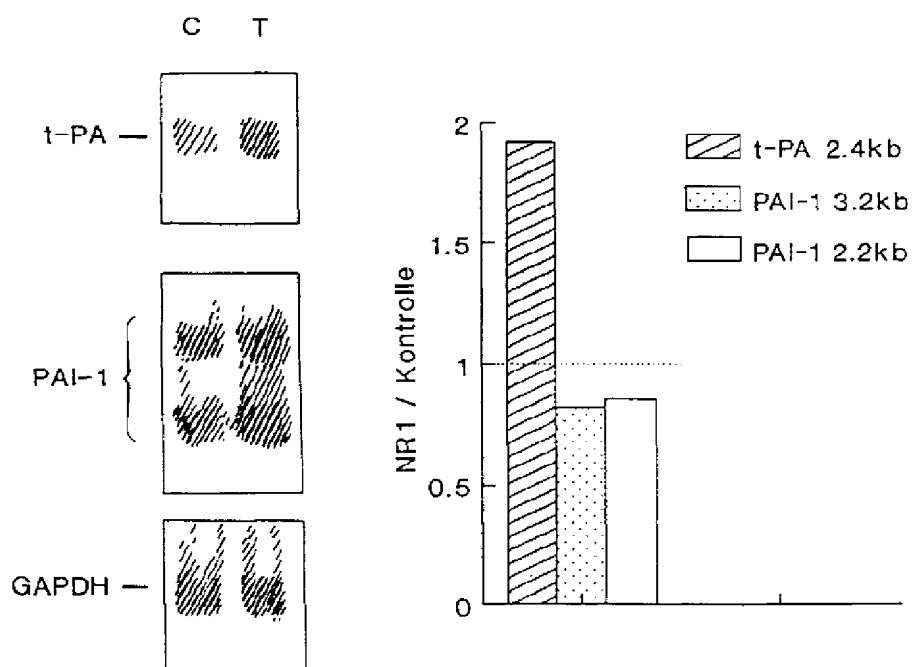


Fig.6

【图5】

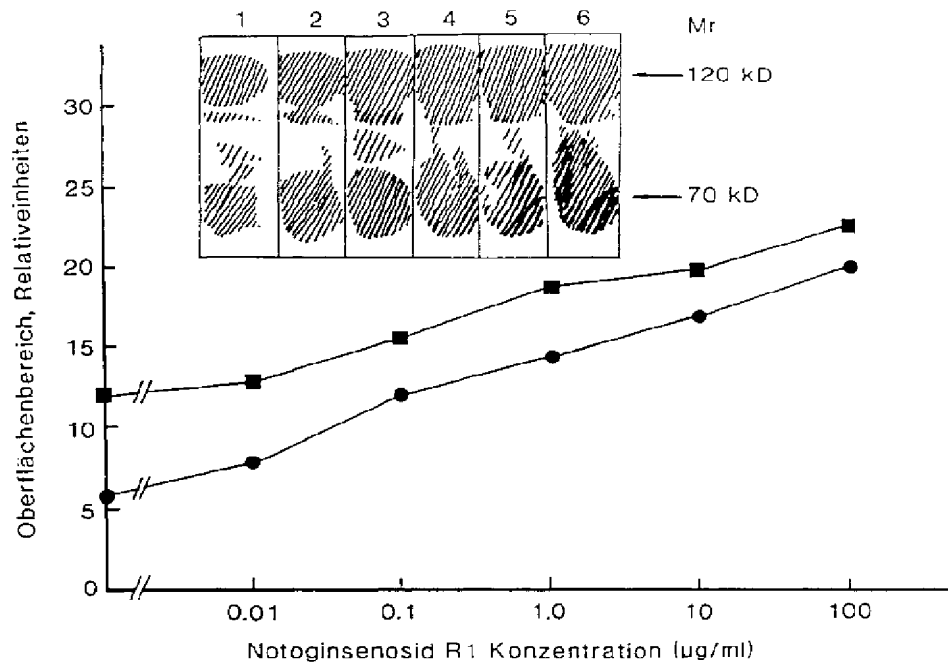


Fig.5A

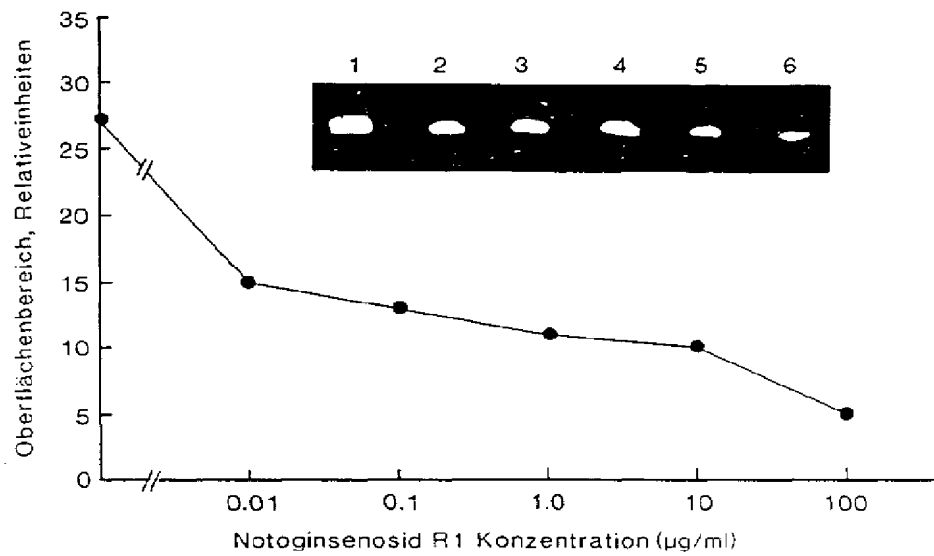


Fig.5B

【図7】

PAI-1 Antigenreproduction nach Behandlung
von LPS und NR1 mit HUVECs

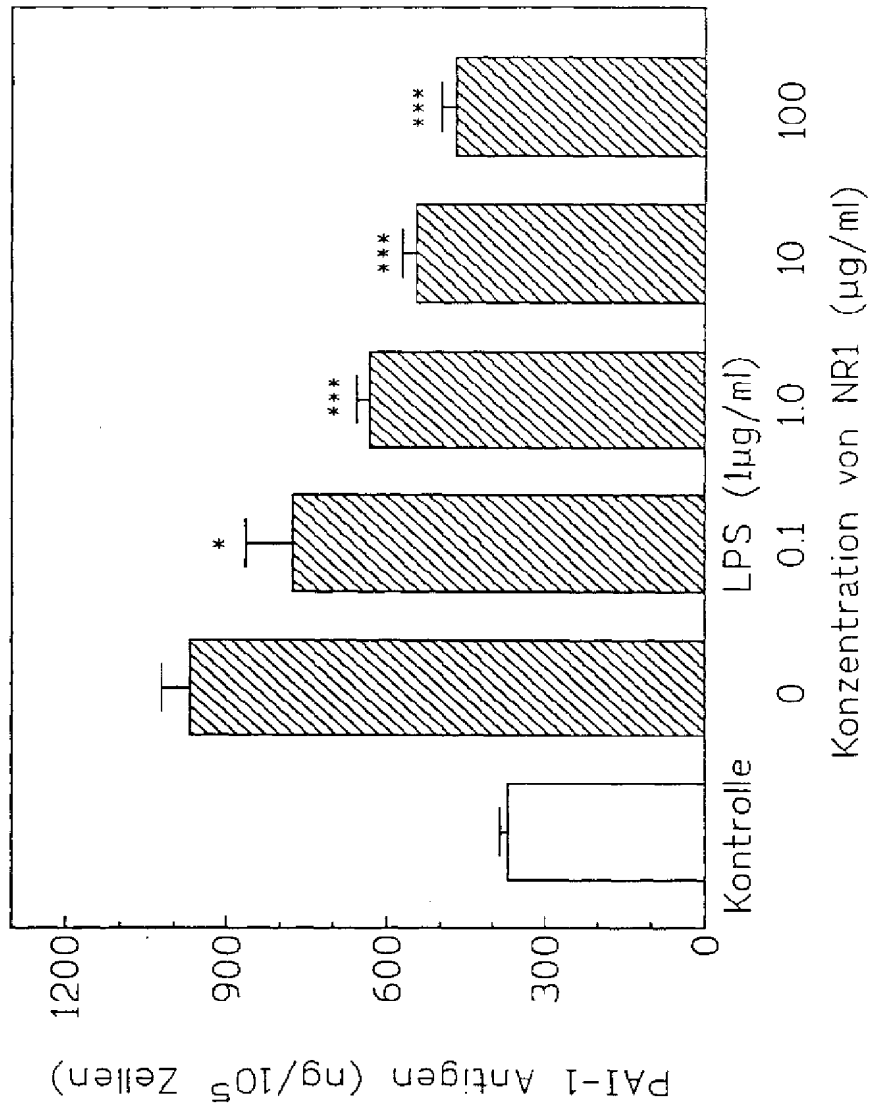


Fig.7

【 図 8 】

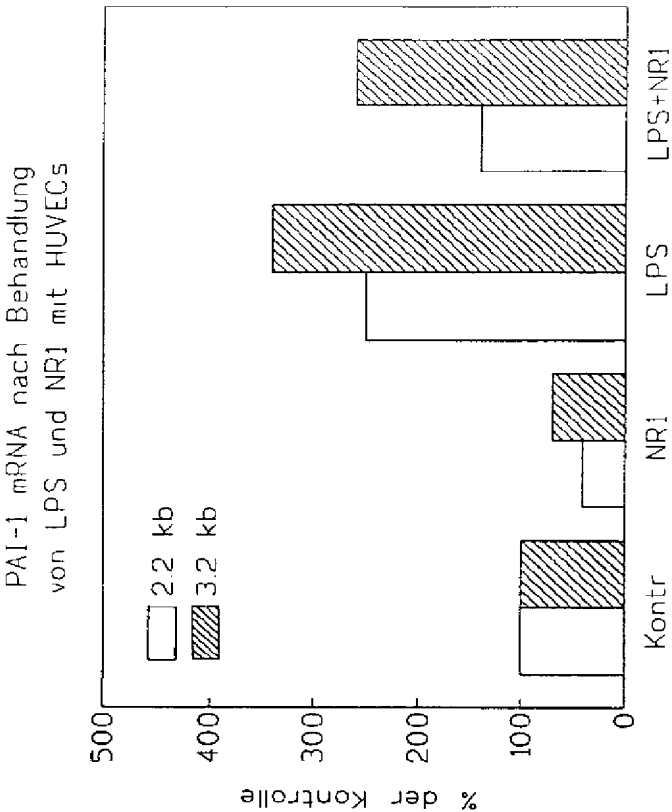
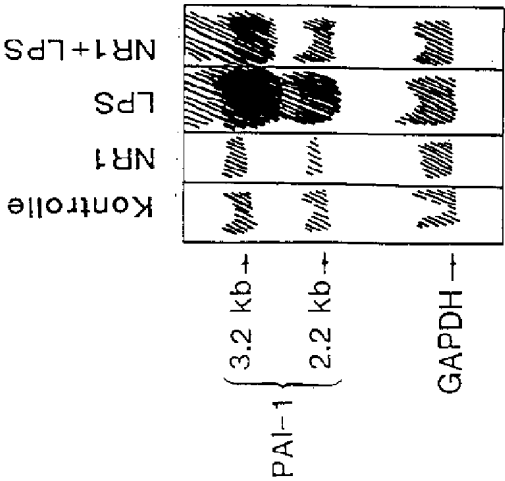


Fig.8



【 図 9 】

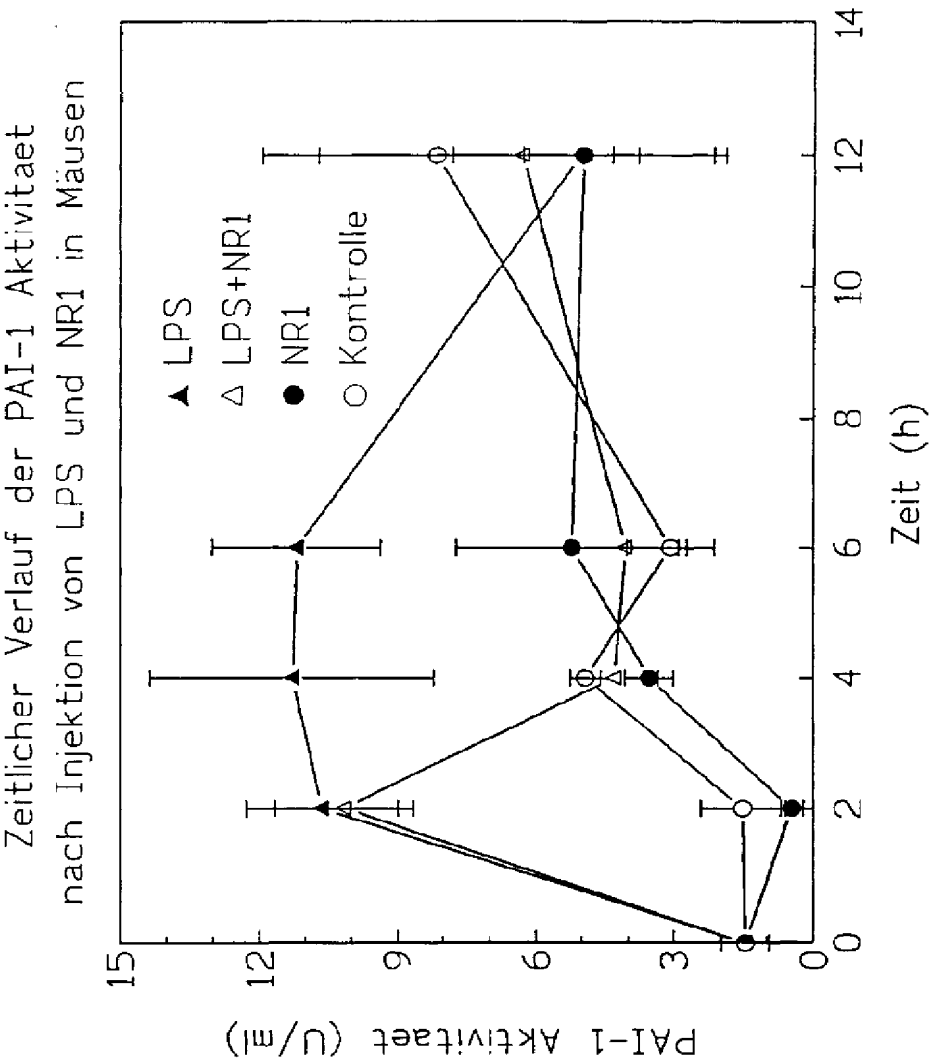


Fig.9

【図10】

Von TF Aktivitaet abhaengige Dosis nach
Koinkubation von LPS mit NR1 in HUVECs

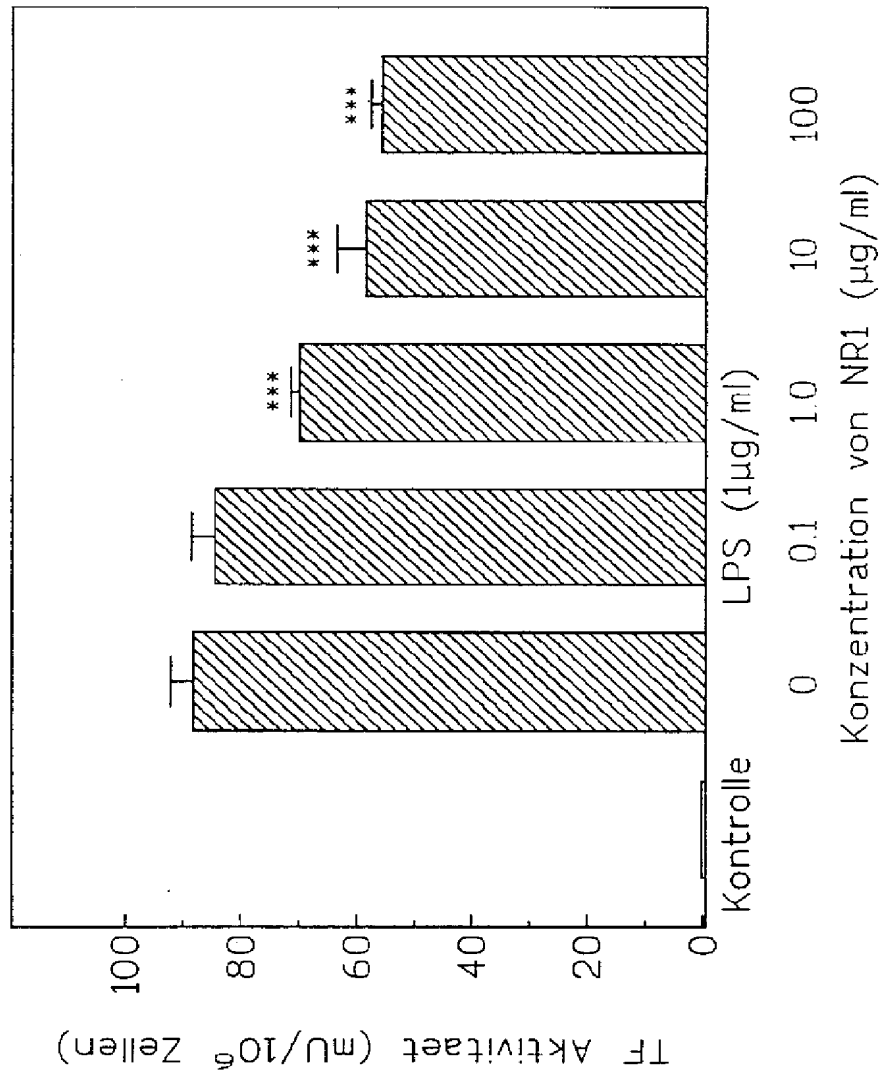


Fig.10

【 図 1 1 】

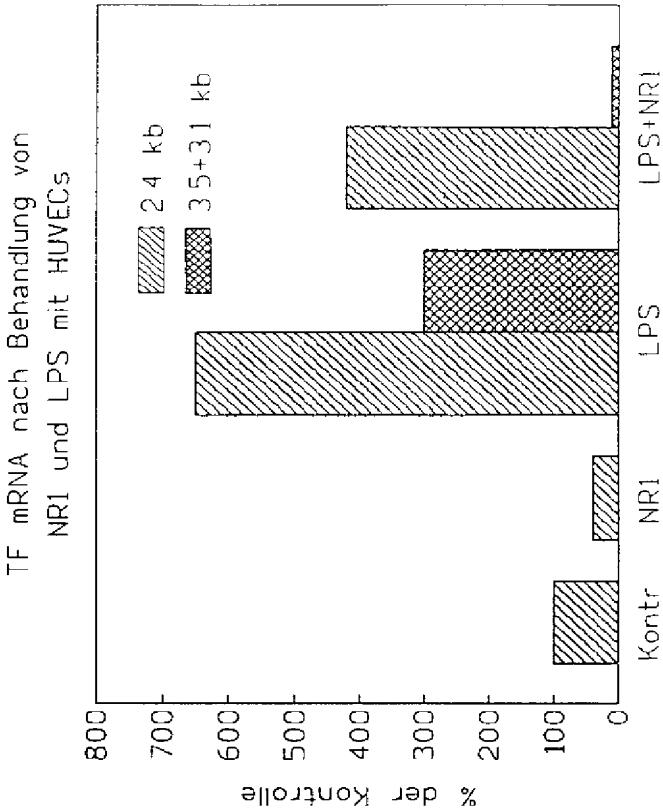
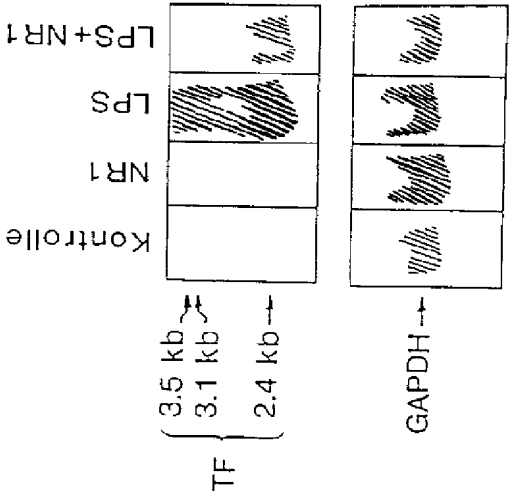


Fig.11



【 図 1 2 】

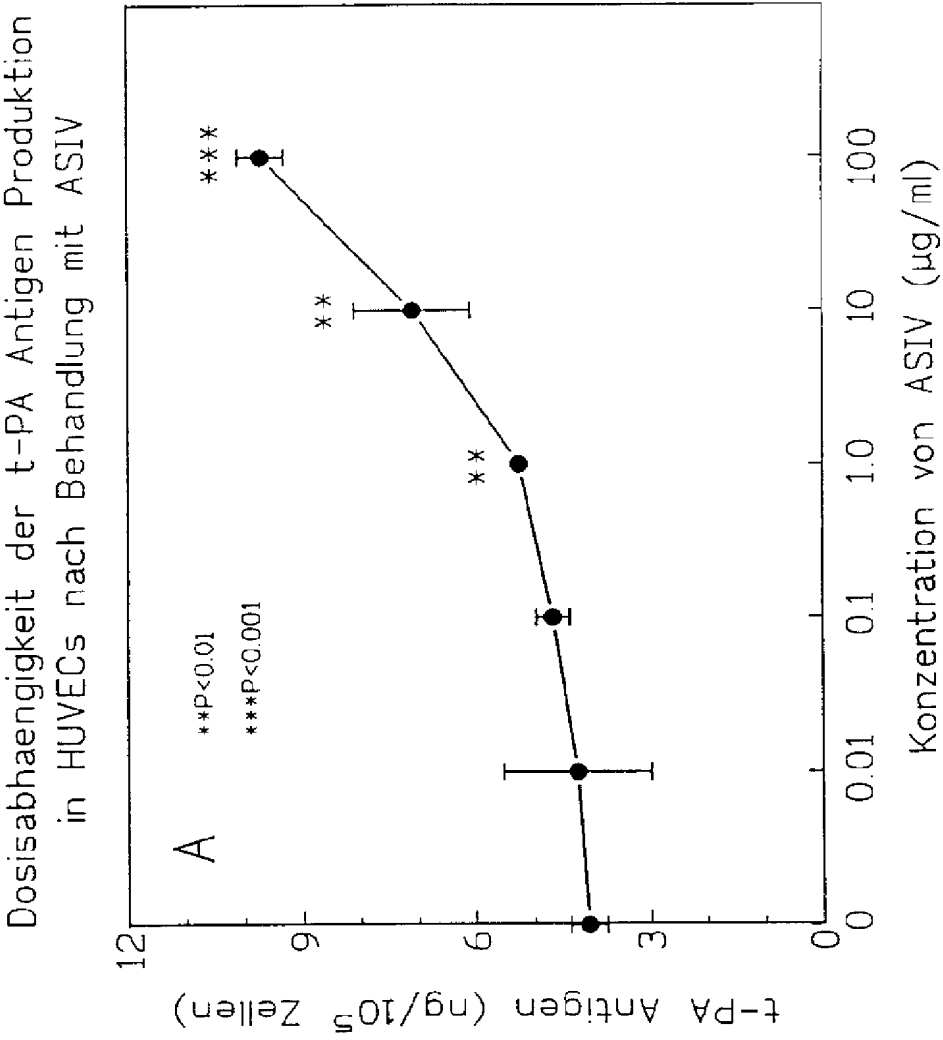


Fig12

【 図 1 3 】

Dosisabhaengigkeit der PAI-1 Antigen Produktion
in HUVECs nach Behandlung mit ASIV

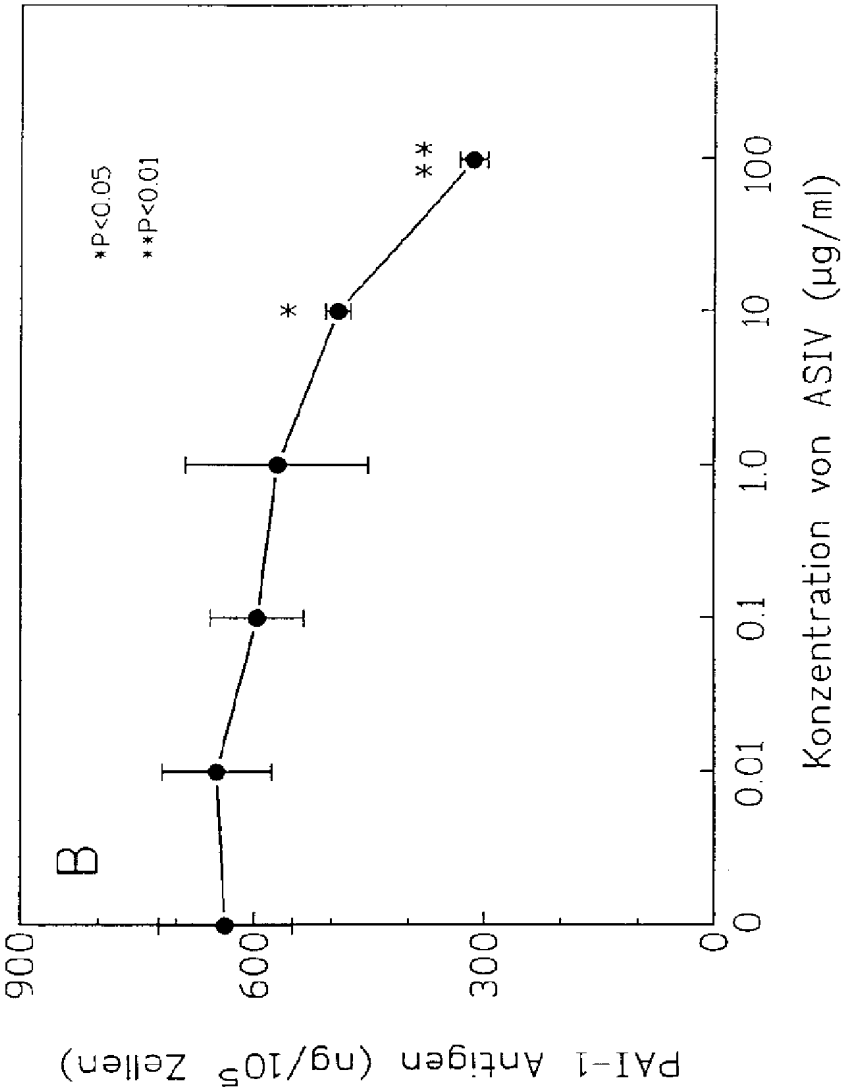


Fig.13

【 図 1 5 】

Dosisabhaengigkeit der PAI-1 Antigen Produktion
in HUVECs nach Behandlung mit LPS oder/und ASIV

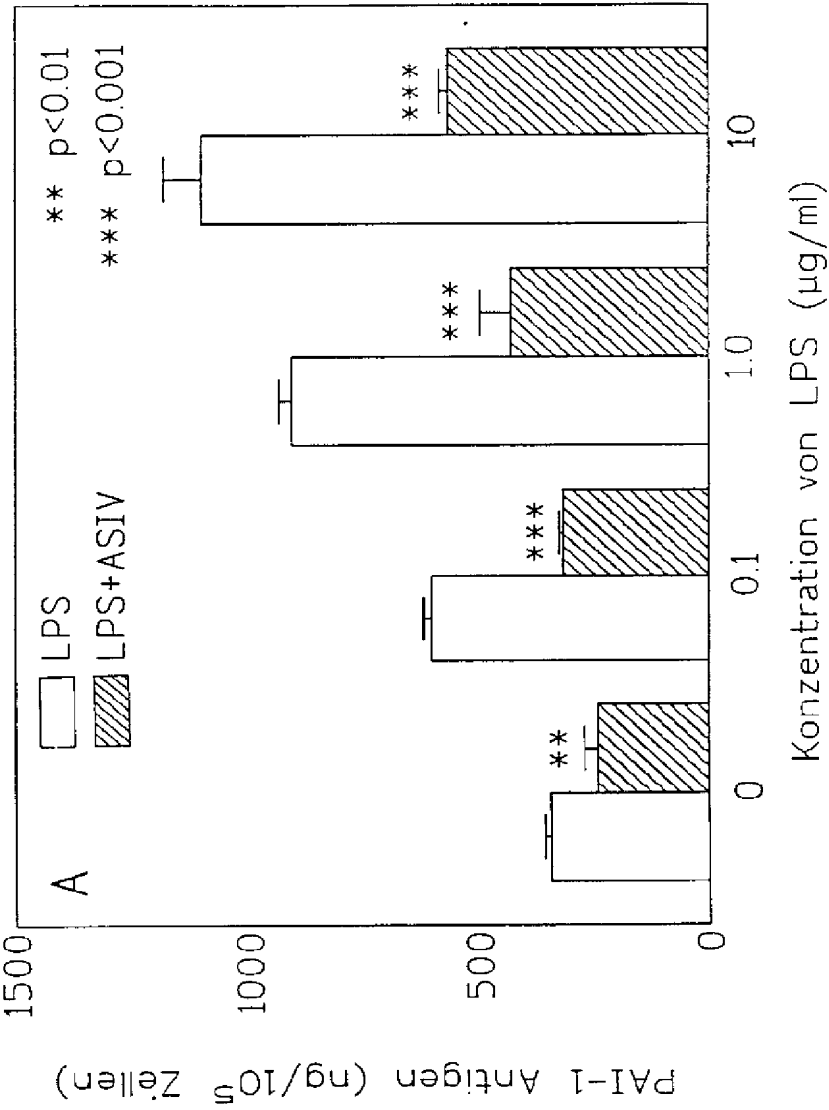


Fig.15

【图 16】

Zeitverlauf der Expression von TF in HUVECs
nach Behandlung mit LPS oder/und ASIV

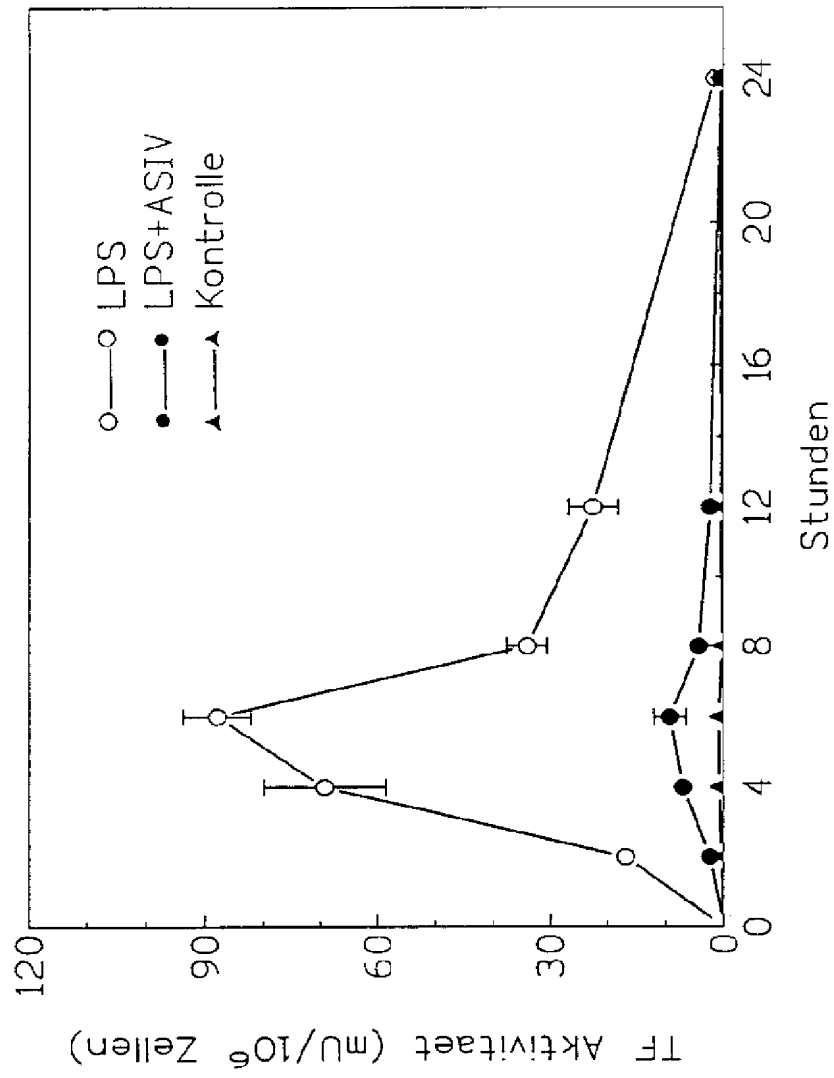


Fig.16

【 図 1 7 】

Gewebe Faktor mRNA in HUVECs nach Behandlung
mit LPS oder/und ASIV

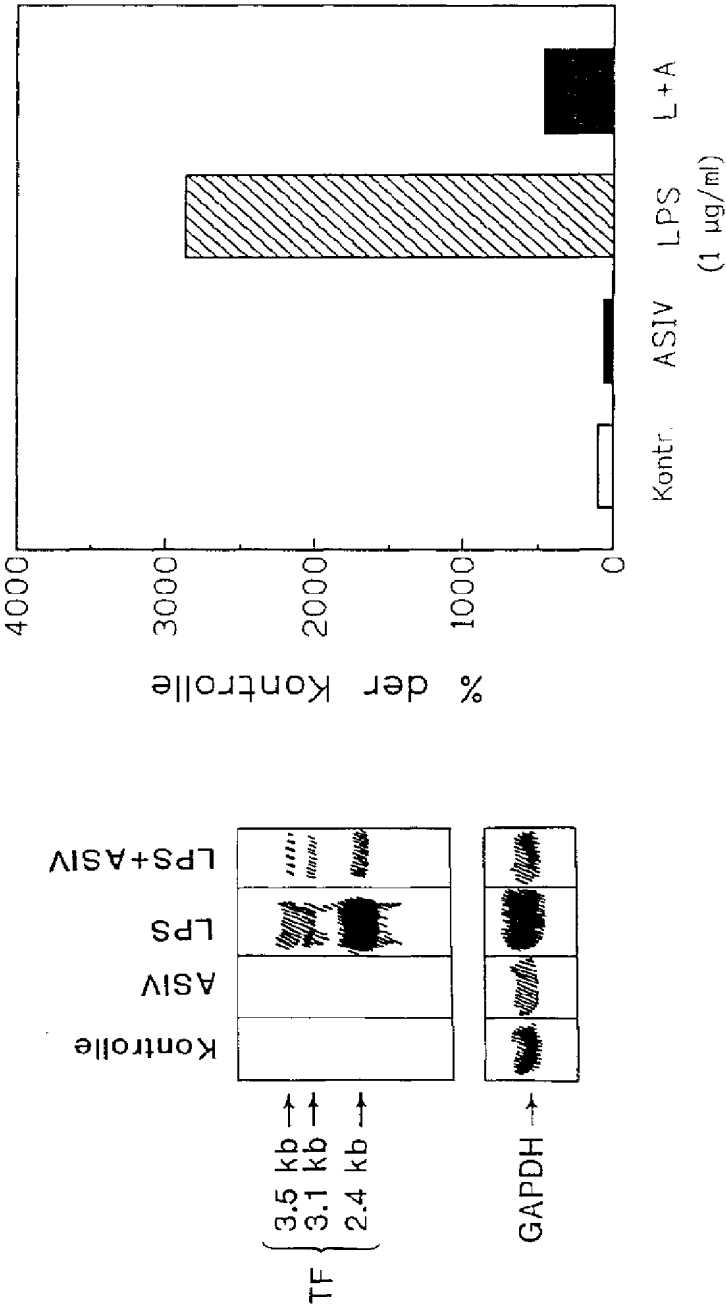
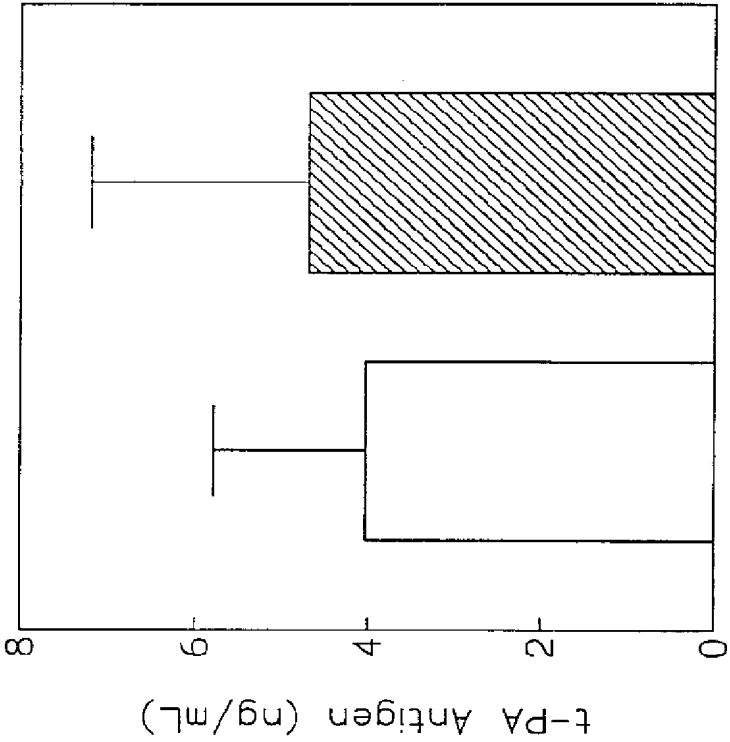


Fig.17

【 図 1 8 】

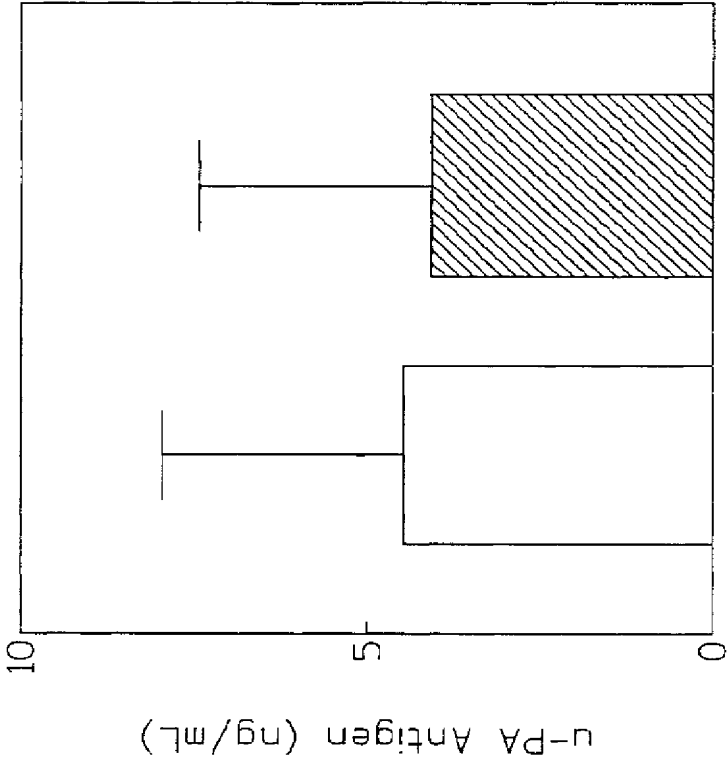
Plasma t-PA Antigen Spiegel nach Gabe von
NR1 haltigem Ginseng



vor Ginseng nach Ginseng
Fig.18

【 図 19 】

Plasma u-PA Antigen Spiegel nach Gabe von
NR1 haltigem Ginseng



vor Ginseng nach Ginseng
Fig.19

【 図 2 0 】

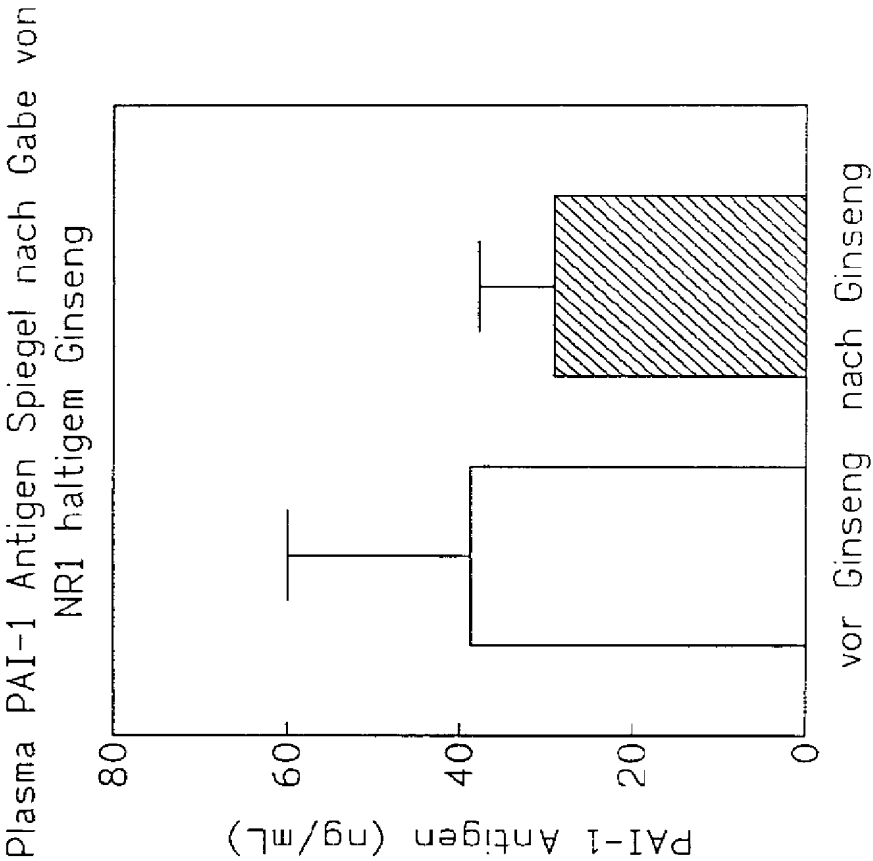


Fig.20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K31/705		International Application No. PCT/AT 95/00049
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PLANTA MEDICA, vol. 55, no. 1, February 1989 pages 18-21, H. MATSUDA ET AL. 'Studies of panax japonicus fibrinolysis' *see abstract*	1,2
X	CHEM. PHARM. BULL., vol. 34, no. 5, May 1986 pages 2100-2104, H. MATSUDA ET AL. 'Pharmacological study on panax ginseng C.A. Meyer IV. Effects of red ginseng on experimental disseminated intravascular coagulation (3) effect of ginsenoside-Ro on the blood coagulative and fibrinolytic system' *see the whole document* --- -/--	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 July 1995		Date of mailing of the international search report 14.08.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Isert, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.

PCT/AT 95/00049

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEM. PHARM. BULL., vol. 34, no. 3, March 1986 pages 1153-1157, H. MATSUDA ET AL. 'Pharmacological study on panax ginseng C.A. Meyer. III. effect of red ginseng on experimental disseminated intravascular coagulation. (2) effects of ginsenosides on blood coagulative and fibrinolytic systems' *see abstract and discussion* ---	1-3
X	CHEM. PHARM. BULL., vol. 39, no. 5, 1991 pages 1185-1188, YOSHIKAWA K. ET AL. 'Structure of two new fibrinolytic saponins from the seed of Luffa cylindrica ROEM' *see abstract* ---	1
P,X	ANNALS OF HEMATOLOGY, vol. 70, no. Suppl., 1995 page A92 W.J. ZHANG ET AL. 'Astragaloside counteracts endotoxin stimulated induction of both plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor in cultured human endothelial cells' *see abstract N° 363* ---	1-5
P,X	FIBRINOLYSIS, vol. 8, no. Suppl. 1, 1994 page 119 W.J. ZHANG ET AL. 'Notoginsenoside R1 counteracts the induction of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor in response to endotoxin stimulation in vitro and in vivo' *see abstract N° 335* ---	1-5
P,X	FIBRINOLYSIS, vol. 8, no. Suppl. 1, 1994 page 150 ZHANG WJ 'Effect of Notoginsenoside R1 on the synthesis of components of the fibrinolytic system in cultured human pulmonary artery vascular cells' *see abstract N° 424* ---	1-5
X	see reference "Thromb. and Haemostat. 69:1275,1993" -----	1-5